



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

Maisons-Alfort, le 1^{er} septembre 2008

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande de mise sur le marché des maïs génétiquement modifiés T25, tolérant au glufosinate d'ammonium pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et produits dérivés au titre du règlement CE N° 1829/2003.

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) a été saisie le 20 juin 2008 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à la demande de mise sur le marché des maïs génétiquement modifiés T25, tolérant au glufosinate d'ammonium, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et produits dérivés au titre du règlement CE N° 1829/2003 (EFSA-GMO-NL-2007-46).

Conformément au Règlement (CE) N°1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, issus de plantes génétiquement modifiées et de rendre un avis à la Commission Européenne. L'AESA a cependant décidé de permettre aux Etats-membres de faire connaître leurs observations sur le dossier initial. C'est dans ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'AFSSA.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 10 juillet 2008, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant :

(A) Information générale

Les maïs portant l'événement de transformation T25 ont été autorisés en 1998 en alimentation animale au titre de la partie C de la directive 90/220/EEC et en alimentation humaine uniquement pour les produits dérivés (amidon et ses dérivés, huile brute et raffinée, produits de transformation) au titre du règlement 258/97.

L'AFSSA a évalué cet OGM en 1999 dans le cadre d'une demande d'autorisation de mise sur le marché d'hybrides obtenus par croisement de deux lignées génétiquement modifiées T25 et MON810. Après consultation de la commission interministérielle et interprofessionnelle de l'alimentation animale, l'AFSSA avait demandé des informations complémentaires.

L'évaluation des risques environnementaux des OGM en rapport avec leur culture n'entre pas dans le champ de compétence de l'AFSSA et le présent avis est relatif à la sécurité alimentaire des maïs portant l'événement T25 pour une utilisation en alimentation humaine et animale.

Les maïs portant l'événement de transformation T25 contiennent une copie fonctionnelle du gène *pat* provenant de *Streptomyces viridochromogenes* codant la phosphinothricine acétyltransférase (PAT). Cette enzyme confère aux maïs la tolérance au glufosinate d'ammonium. L'événement de transformation T25 a été introgressé dans de nombreuses variétés de maïs grain et de maïs doux adaptées aux diverses zones de cultures du maïs. 7,6 millions d'hectares de maïs T25 ont été cultivés en Amérique du nord entre 1998 et 2006 (soit 0,8 million d'hectare par an en moyenne représentant 1,6% du maïs cultivé dans cette zone).

(C) Informations relatives à la modification génétique

- (1) Les maïs T25 ont été obtenus par transformation de protoplastes issus de cellules hautement embryogènes (lignée HE/89) par choc osmotique en présence de polyéthylène

glycol et d'ADN du plasmide pUC/AC. Les plantes de maïs transformées ont été régénérées sur milieu solide en présence de phosphinotricine.

- (2) Le vecteur est constitué d'une origine de répllication fonctionnelle chez *E. coli*, du gène *bla* codant la β -lactamase et de la cassette d'expression chimérique *pat* comprenant :
- ✓ les séquences promotrices du gène 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur ;
 - ✓ le gène synthétique *pat* de *Streptomyces viridochromogenes* optimisé pour son expression dans le contexte végétal ;
 - ✓ la séquence de terminaison du gène 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur.
- Le gène *bla*, sous contrôle des séquences de régulation exclusivement bactérienne, confère aux bactéries la résistance à l'ampicilline.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (1) La protéine PAT exprimée dans les maïs T25 est l'enzyme phosphinotricine acétyltransférase, elle lui confère le caractère de résistance à l'herbicide glufosinate d'ammonium qui inhibe l'activité de la glutamine synthase. La protéine PAT métabolise le L-glufosinate (la forme active de l'herbicide) en N-acétyl-L-glufosinate (NAG) qui n'est pas phytotoxique.

Les analyses de type Southern, utilisant une large gamme d'enzymes de restriction et de sondes correspondant au promoteur 35S et au plasmide pUC/AC, montrent sans ambiguïté qu'une seule insertion est présente dans le génome des maïs. Ces analyses permettent de définir la nature et l'organisation des séquences insérées. La structure de l'insert a été confirmée par séquençage.

La séquence insérée dans le génome du maïs T25 mesure 4139 pb, ce qui correspond à un peu plus d'une fois la totalité du plasmide pUC/AC. L'insertion comporte les éléments suivants :

- ✓ la cassette intacte d'expression du gène *pat* (p35S-*pat*-t35S)
- ✓ une partie de la séquence du gène *bla* (77% de l'extrémité 3' du gène sans l'ATG) fusionné au promoteur 35S tronqué en 5' (66% du promoteur).

D'autres séquences plasmidiques sont insérées en plus de ces éléments.

Le séquençage des régions flanquant l'insertion a été réalisé, ainsi 308 pb en 5' et 150 pb en 3' de l'insertion ont été déterminées. Ce séquençage a permis de mettre en évidence une délétion de 20 pb au niveau du site d'insertion.

Les analyses de type blast réalisées en 2008 montrent que ces séquences 5' et 3' ont de fortes homologies (90 à 97%) avec plusieurs locus du génome nucléaire de maïs (*Zea mays bz*, *adh1*, alpha-zéine, gène b1). L'insertion T25 a eu lieu dans un des blocks de rétrotransposon *Huck-2* localisé à proximité des gènes cités ci dessus.

Une analyse bioinformatique permettant d'identifier les ORF (« Open Reading Frame », en français, phase ouverte de lecture) putatives ainsi que des structures spécifiques des gènes telles que les éléments de régulation de la transcription, les sites de liaison aux ribosomes, les signaux de polyadénylation a été conduite sur les séquences des régions de jonction.

Six phases ouvertes de lecture (ORF) nouvelles, deux en 5' de l'insertion et quatre en 3' ont été identifiées. Aucun élément de régulation pour initier la transcription de ces ORF n'a été repéré. Les séquences peptidiques déduites des 6 ORF ne présentent aucune homologie avec les séquences de toxines ou d'allergènes répertoriés dans les bases de données. L'analyse des régions génomiques en bordure de l'insert a été conduite à partir de séquences très courtes en 5' et 3'. Des informations de séquences plus importantes permettraient d'écartier les imprécisions liées au polymorphisme du lieu d'insertion.

(3) Informations relatives à l'expression des produits de gène

Le caractère apporté par l'événement de transformation T25 est la tolérance au glufosinate d'ammonium. Ce dernier est appliqué dès le début du développement de la plante jusqu'au stade 7 feuilles. Le niveau de tolérance est directement lié à la quantité d'enzyme présente dans les feuilles. Des analyses réalisées en 1996 au Canada sur des échantillons foliaires prélevés au stade 6 feuilles ont montré une forte expression et un taux de protéine PAT allant de 946 à 1343 ng/g de poids frais. L'activité enzymatique de PAT a été mesurée dans

les tiges, les feuilles, les racines et les grains. L'activité maximale est détectée dans les tiges et les feuilles. Elle est dix fois inférieure dans les racines et 100 fois dans les grains.

Le gène *bla* tronqué sans l'ATG sous contrôle d'un fragment du promoteur 35S ayant été inséré dans le génome des maïs T25, des analyses par northern blot utilisant des sondes ARN antisens et des mesures de l'activité *in vitro* de la β -lactamase montrent une absence d'expression du gène *bla* et d'activité β -lactamase dans les tissus des maïs T25.

(5) Informations relatives à la stabilité génétique de l'insert et à la stabilité phénotypique de son expression

Plusieurs études ont montré la stabilité génétique et phénotypique de l'insertion T25 :

- ✓ des hybridations moléculaires de type Southern réalisées sur le transformant primaire et 3 individus indépendants issus de backcross de 3^{ème} génération ;
- ✓ les profils de ségrégation de lignées élites dans lesquelles l'événement T25 a été introgressé par backcross (jusqu'à 8 générations) et de ces mêmes descendants après autopollinisation ;
- ✓ les profils de ségrégation de populations hémizygotés pour T25 croisées avec plus de 40 lignées élites et cultivés pendant deux saisons en France et aux Etats-Unis.

Les résultats de ces analyses montrent que le caractère de tolérance au glufosinate d'ammonium est stable et suit un profil de ségrégation mendélien pour un caractère dominant situé à un locus unique.

La stabilité de la protéine PAT a été mesurée en quantifiant son niveau d'expression au cours de 3 générations successives de backcross. Le niveau moyen d'accumulation de PAT dans les feuilles est stable et voisin de 30 μ g/g de poids sec.

(7) Informations relatives aux effets toxiques, allergiques, et autres effets délétères pour la santé humaine et animale

(7.1.3) Les analyses de composition chimique ont été réalisées à partir de variétés de maïs grain et de variétés de maïs doux. Les variétés de maïs grain ont été cultivées sur 15 sites (4 répétitions par site) en Europe et aux Etats-Unis pendant deux années successives (1999 et 2000). Les variétés de maïs doux ont été cultivées en 2002 et 2003 sur 14 sites (4 répétitions par site) de six états des Etats-Unis. Les comparaisons concernent les maïs T25 traités par un herbicide conventionnel, les maïs T25 traités par le glufosinate d'ammonium et les maïs témoins isogéniques traités par un herbicide conventionnel. La moyenne des teneurs mesurées est comparée à des valeurs de référence issues de la littérature.

L'analyse de la composition chimique des grains des variétés de maïs grain a porté sur la teneur en eau, en protéines, en lipides, en fibres totales, en cendres et en hydrates de carbone totaux et libres. Les composés chimiques suivants ont été comparés : 10 minéraux, 7 vitamines, 18 acides aminés, 21 acides aminés libres, 12 acides gras et 12 acides gras libres. Cette étude a été complétée par l'analyse des teneurs en vitamines B6 sur des graines provenant de maïs cultivés en 2006 dans le Dakota aux Etats-Unis.

L'analyse de la composition chimique des grains de variétés de maïs doux a porté sur la teneur en eau, en lipides, en cendre, en hydrates de carbone, en fibres totales, solubles dans les détergents acides et neutres. Les composés chimiques suivants ont été comparés : 9 hydrates de carbone simples et complexes, 18 acides aminés, 27 acides gras, 9 minéraux, 9 vitamines, 2 facteurs anti-nutritionnels.

Pour évaluer l'équivalence en substance du maïs portant l'événement de transformation T25, deux approches statistiques ont été employées. La première consiste à comparer par site les valeurs moyennes obtenues à partir des maïs T25 traités ou non avec celles des maïs témoins isogéniques et à compter le nombre de sites où des différences significatives (différences excédant la variation normale du comparateur) sont observées pour chaque composé. La seconde approche est une analyse de variance tous sites confondus comparant les valeurs moyennes obtenues à partir des maïs T25 traités ou non, avec celles des maïs témoins.

Les résultats obtenus ne montrent pas de différences significatives pour tous les composés mesurés entre les variétés de maïs grain portant l'événement T25 et les variétés de maïs

témoin non génétiquement modifiées. Concernant les variétés de maïs doux, on observe seulement quelques différences significatives pour le calcium, le fer et le manganèse qui présentent des teneurs légèrement plus élevées dans le maïs T25. Ces différences sont toutefois très faibles et les valeurs mesurées entrent dans la plage de fluctuation des données de références de composition des variétés de maïs.

(7.6) Effet du procédé de traitement

Les variétés de maïs T25 sont destinées aux mêmes utilisations et transformations que les variétés de maïs conventionnelles, l'événement peut être introduit dans une variété de maïs doux dont le grain est directement consommé par l'homme. Les teneurs en protéine PAT ont été déterminées dans de nombreux produits dérivés issus de la transformation des grains. La teneur dans les grains avant transformation est de 130ng/g de poids sec. Les valeurs les plus élevées sont relevées dans le germe et le germe délipidé (300ng/g de poids sec). La protéine PAT n'est pas détectable dans l'huile (tableau 1).

Tableau 1 : valeurs moyennes de protéine PAT mesurées dans les produits dérivés de grains de maïs « grain » et de maïs « doux ».

Produits	Quantité de protéine PAT/produit ng/g de poids frais
Maïs grain :	
Grain	130
Son	46
Farine	17,2
Germe délipidé	303
Huile brute	non détectable
Maïs doux :	
Grain frais	1310
Grain congelé	485
Grain appertisé	2,43

(7.7) Utilisation et consommation prévue

La consommation de protéine PAT chez l'homme et chez les espèces animales cibles est calculée sur la base de données de consommation de maïs et de produits dérivés enregistrés par l'OMS et l'USDA.

Ces estimations de consommation sont maximalisées dans le sens où l'on considère que la totalité du maïs consommé serait du maïs T25, alors qu'il ne représente en 2003 qu'environ 1.6 % de la totalité du maïs cultivé sur le territoire nord-américain et 0.7 % du maïs cultivé dans le monde.

Les données calculées cumulant une consommation de maïs T25 standard et de maïs T25 doux frais, sont estimées dans cette hypothèse à environ 17 µg de protéine PAT par personne et par jour.

(7.8) Toxicologie

(7.8.1) Evaluation de la sécurité de la protéine PAT

La sécurité de protéines de type PAT a déjà été évaluée à plusieurs reprises puisque PAT est déjà exprimée dans différentes plantes génétiquement modifiées précédemment autorisées.

L'organisme donneur est *Streptomyces hygroscopicus*, une bactérie non pathogène du sol présente à l'état naturel dans l'environnement de l'homme. Les protéines PAT sont donc largement répandues dans l'environnement y compris dans l'alimentation. Elle bénéficie d'un recul d'utilisation en alimentation humaine et animale et aucun risque pour la santé des consommateurs n'a été rapporté à ce jour.

L'action de la protéine PAT est très spécifique de son substrat L-phosphinothricine et elle n'acétyle pas d'autres L-acides aminés.

Outre ces informations, des expériences récentes permettent de compléter l'évaluation de la sécurité de la protéine PAT. Ces études sont :

- ✓ des analyses de la séquence de la protéine PAT montrant qu'elle ne présente pas d'homologie de séquences avec des protéines toxiques connues ;

- ✓ une étude de toxicité aiguë de la protéine PAT produite par *E. coli* (pureté >90%), administrée par voie intraveineuse chez la souris aux doses de 1 et 10 mg/kg de poids corporel, n'induisant pas d'effet néfaste. Aucune létalité et aucun signe clinique particulier ne sont observés chez les animaux suivis pendant 15 jours ;
- ✓ une étude par administration orale répétée pendant 14 jours de la protéine PAT produite par *E. coli* chez le rat montrant qu'aux doses de 0,71 et de 7,6 g/kg p.c. chez le mâle et qu'aux doses de 0,7 et de 7,96 g/kg p.c. chez la femelle, aucun effet lié au traitement ayant une signification toxicologique n'a été observé ;
- ✓ une expérience sur la thermostabilité de la protéine montrant que l'enzyme PAT est inactive après un traitement à 50°C ;
- ✓ des expériences de digestion *in vitro* démontrant que la protéine PAT est fortement instable en milieu gastrique et intestinal. La protéine PAT est rapidement dégradée en milieu gastrique simulé (30 secondes en présence de pepsine à pH 2), de même qu'en milieu intestinal simulé en présence de pancréatine (5 minutes à pH 7,5).

L'équivalence entre la protéine PAT produite par *E. coli* utilisée pour les essais sur les rongeurs avec la protéine exprimée dans la plante a été démontrée.

(7.8.2) Etude de la toxicité sub-chronique

Aucune étude de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat avec l'aliment n'a été réalisée.

(7.9) Allergénicité

L'évaluation de l'allergénicité repose sur les éléments suivants :

- ✓ l'organisme donneur de la protéine n'est pas connu pour être à l'origine d'allergène ;
- ✓ la recherche d'identité de séquence des acides aminés de la protéine PAT (comparaison de séquences de 80 acides aminés et recherche de 8 acides aminés contigus) avec des séquences de protéines connues pour être allergènes n'a pas mis en évidence de telles identités ;
- ✓ la protéine PAT est sensible à la protéolyse en milieu acide (fluide gastrique simulé) et neutre (fluide intestinal simulé) ;
- ✓ l'absence de site de glycosylation dans la séquence de PAT ;
- ✓ la faible teneur en protéine PAT dans les grains de maïs ;
- ✓ le fait que parmi les nombreuses variétés de plantes cultivées génétiquement modifiées pour exprimer la même protéine PAT, aucun cas d'allergénicité due à cette protéine n'a été rapporté à ce jour.

Il convient de noter que ces données ne suffisent pas, pour autant, à conclure de façon certaine à l'absence d'un potentiel toxique et allergénique mais, qu'en l'état actuel des connaissances, une telle certitude ne pourrait être obtenue pour aucune protéine.

(7.10) Evaluation nutritionnelle

Deux études visant à montrer l'équivalence nutritionnelle des variétés de maïs « grain » T25 avec leurs témoins non transgéniques ont été menées chez les animaux cibles (poulets et vaches laitières). Les variétés de maïs doux T25 n'ont pas fait l'objet d'une évaluation de son équivalence nutritionnelle alors que cette évaluation est réalisable chez le poulet (Chi and Speers, 1973¹).

L'étude d'alimentarité chez le poulet a été réalisée en 1996 sur 280 poussins mâles (140 animaux par traitement, 2 traitements) nourris pendant 42 jours avec trois régimes successifs correspondant aux périodes de démarrage, de croissance et de finition dont le taux d'incorporation de grain de maïs dans les rations sont respectivement de 57, 61 et 66%. Les animaux nourris à base de grain de maïs T25 sont comparés à ceux nourris à base de grain de maïs témoin. Les conditions de culture des maïs T25 ayant été utilisées

¹ Chi, M.S. and Speers, G.M. 1973. Nutritional value of high lysine corn for the broiler chick. Poultry Science 52: 1148-1157.

dans cette expérimentation ne sont pas détaillées et par conséquent, le traitement ou non des maïs au glufosinate d'ammonium n'est pas renseigné.

Les observations ont porté sur la croissance des animaux (mesure du poids à 0, 18, 32 et 42 jours, mesure du gain de poids), la quantité de nourriture absorbée et l'efficacité alimentaire. De plus, 5 données de découpe (dont le poids de la carcasse, du tissu adipeux abdominal et du muscle pectoral) ainsi que le taux de mortalité ont été considérés.

Les résultats, après analyse statistique, montrent qu'on n'observe aucune différence due aux traitements entre les animaux nourris avec le maïs grain T25 et le maïs témoin pour les paramètres, cités ci dessus.

Une seconde étude d'alimentarité publiée (Phipps *et al.*, 2006²) a porté sur 64 vaches laitières soumises à un régime à base d'ensilage et de grain de maïs. L'expérience a consisté à comparer les effets du traitement sur 16 vaches par traitement pendant 12 semaines. Les traitements sont T1 régime à base de maïs ensilage portant l'événement de transformation T25, T2 maïs témoin isogénique (de T25), T3 la variété commerciale Fabius et T4 la variété commerciale Antares.

Les paramètres de production et de composition du lait (10) ne montrent pas de différence entre les 4 traitements, permettant de conclure à l'équivalence nutritionnelle entre les variétés de maïs ensilage portant l'événement T25 et la variété témoin isogénique ainsi qu'avec les deux autres maïs de variété commerciale.

Par ailleurs, sur 90 échantillons de lait collectés à l'issue des semaines 1, 6 et 12 de l'expérience, aucun ne contenait d'ADN correspondant au T-DNA, de même que la protéine PAT n'est pas détectable par ELISA dans le lait.

Conclusion de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments

Le dossier présente des données bien documentées sur la composition chimique des maïs (variétés « grain » et « doux ») portant l'événement de transformation T25. Ces données permettent de conclure à l'équivalence en substance de ces maïs avec leurs témoins isogéniques non transformés et avec d'autres variétés équivalentes commerciales. De même, les études d'alimentarité menées chez le poulet et la vache laitière démontrent l'équivalence nutritionnelle des maïs grain T25 avec les maïs témoins ou conventionnels.

Les maïs portant l'événement de transformation T25 sont autorisés en France depuis 1998 en alimentation animale pour la plante GM et en alimentation humaine pour les produits dérivés. Ils ont été autorisés aux Etats-Unis en 1995 et dans 11 pays à travers le monde entre 1997 et 2003. Cependant, aucune information qui permettait de prendre en compte le recul d'utilisation de ces maïs dans ces pays n'est fournie, en particulier celles concernant l'importation et l'utilisation des maïs T25 et de leurs produits dérivés déjà autorisés en Europe depuis 1998.

Compte tenu de l'absence d'une étude de toxicité sub-chronique 90 jours chez le rongeur avec l'aliment, les données relatives au recul d'utilisation apparaissent comme un préalable nécessaire pour que l'agence française de sécurité sanitaire des aliments soit en mesure de se prononcer sur la sécurité sanitaire des variétés de maïs portant l'événement de transformation T25 et de leurs produits dérivés.

Mots-clés : OGM, maïs T25, tolérance au glufosinate.

La Directrice Générale

Pascale BRIAND

27-31, avenue
du Général Leclerc
94701

Maisons-Alfort cedex
Tel 01 49 77 13 50
Fax 01 49 77 26 13
www.afssa.fr

REPUBLIQUE
FRANÇAISE

²Phipps RH, Jones AK, Tingey AP, Abeyasekera S. Effect of corn silage from an herbicide-tolerant genetically modified variety on milk production and absence of transgenic DNA in milk. J Dairy Sci. 2005 88:2870-2878.